

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 196 46 372 C 1

⑯ Int. Cl. 6:  
C 12 N 15/11  
C 12 N 15/10

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯  
11.11.95 EP 95 11 7787.2

⑯ Patentinhaber:  
EVOTEC BioSystems GmbH, 22529 Hamburg, DE

⑯ Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

⑯ Erfinder:  
Pschorr, Johannes, Dr., 22087 Hamburg, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Recherche in CA, BIOSIS, WPIDS;

⑯ Genotyp und Phänotyp koppelnde Verbindung

⑯ Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A neben anderen Bereichen mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebautes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierenden Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

DE 196 46 372 C 1

DE 196 46 372 C 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp) gemäß Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie ein Verfahren zur molekularen Genotyp/Phänotyp Kopplung durch Herstellung eines Fusionsproduktes gemäß der erfindungsgemäßen Verbindung nach Anspruch 12.

Eine Kopplung von Genotyp und Phänotyp ist insbesondere für die evolutive Biotechnologie wünschenswert, da auf diese Weise nach der Selektion von Peptid-Molekülen mit besonderen oder verbesserten Eigenschaften direkt auf deren codierende Sequenz zurückgegriffen werden kann. Es sind Verfahren beschrieben worden, die eine derartige Kopplung ermöglichen. Es handelt sich hierbei in erster Linie um Verfahren, welche die zu selektierenden Moleküle *in vivo* auf einer Oberfläche präsentieren z. B. auf einer Phagen-Oberfläche (Phage Display) auf einer Bakterienoberfläche (Bacterial Surface Display) oder auch direkt auf molekularer Ebene (Molecular Display). Diese *in vivo* Verfahren zeichnen sich jedoch durch gravierende Nachteile aus. So ist, z. B. durch Transformation bedingt, die Repertoire-Größe auf etwa  $10^8$  verschiedene Moleküle beschränkt. Selbst durch ein *in vivo* Diversifizierungsverfahren ließe sich das verfügbare Repertoire nur auf etwa  $10^{12}$  Moleküle erweitern. Theoretisch möglich wäre jedoch eine Diversität von  $> 10^{15}$  Molekülen. Darüberhinaus würden *in vivo* Systeme die Expression cytotoxischer Gene nicht gestatten. Zudem erlauben derartige Systeme nur wahlweise den direkten Zugriff auf cytoplasmatische oder auf sekretorische Proteine. Diese *in vivo* Systeme sind zudem mit einem biologischen Sicherheitsrisiko behaftet, das in einigen Ländern die Arbeit mit derartigen Systemen nur eingeschränkt zuläßt.

Darüberhinaus ist ein *in vitro* Verfahren beschrieben, in dem DNA-Moleküle, welche die Sequenz eines Peptides und die eines Streptavidin-Bindungspeptides enthalten, *in vitro* transkribiert werden. An die Transkripte wird chemisch ein Streptavidin geknüpft, so daß bei der *in vitro* Translation die codierende RNA-Matrize mit dem entstandenen Peptid verknüpft wird. Dieses Verfahren besitzt jedoch mehrere Nachteile. So sind die Wechselwirkungen zwischen Streptavidin und dem Streptavidin-Bindungsprotein unter bestimmten Assay-Bedingungen nicht stabil. Zudem können Wechselwirkungen zwischen dem Streptavidin einer mRNA und dem Streptavidin-Bindungsprotein eines nicht von dieser mRNA codierten Fusionsproteins auftreten. Darüberhinaus kann eine Beeinflussung der Faltungsstruktur des zu selektierenden Peptides durch das Streptavidin-Bindungsprotein auftreten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein risikominimiertes Verfahren zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung anzugeben, und ein Konstrukt bereitzustellen, welche die bislang erreichbare Diversität übersteigen, die Expression cytotoxischer Gene und auch gleichermaßen die Selektion sowohl von cytoplasmatischen als auch sekretorischen Proteinen ermöglichen und zudem nicht auf rekombinante Zellen angewiesen sind. Es sollen zudem insbesondere die Nachteile des oben beschriebenen *in vitro* Verfahrens vermieden werden.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem wird gelöst durch eine Verbindung gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren gemäß Anspruch 12 zur molekularen Genotyp/Phänotyp Kopplung.

Die erfindungsgemäße Verbindung besteht aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebautes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierende(n) Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

Die dauerhafte Verknüpfung der Struktureinheiten A und B kann insbesondere durch Verwendung eines ribosomalen Translationssystems erfolgen.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff Terminator eine Strukturuntereinheit, welche die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verknüpft. Als Terminationen können erfindungsgemäß nucleophile chemische Gruppen, insbesondere organische Aminogruppen, verwendet werden, welche einen Carbonsäureester, insbesondere zwischen einer tRNA und der Struktureinheit B, unter Ausbildung einer dauerhaften, insbesondere kovalenten Bindung zu spalten vermögen. So können zum Beispiel aliphatische, zyklische oder aromatische Verbindungen, mit einer Aminogruppe, natürliche oder nicht natürliche Aminosäuren und Derivate, oder auch Puromycin und Derivate verwendet werden. Bei Verwendung eines ribosomalen Translationssystems enthält der Terminator vorzugsweise zusätzlich eine stabile Molekülgruppe, die die 2'-3'-ortho-Ester-Struktur einer Aminoacyl-tRNA im Komplex mit Elongationsfaktor EF-Tu und GTP initiiert und daher vom Elongationsfaktor gebunden wird.

Die Kopplungsreaktion kann zufällig erfolgen, jedoch ist es erfindungsgemäß vorteilhaft, die Verknüpfung der Struktureinheit A mit der durch Translation entstandenen Struktureinheit B über eine auf der Struktureinheit A angeordnete zweite Strukturuntereinheit wie z. B. ein Terminatorcodon zu steuern.

Bei dem Terminatorcodon kann es sich um zufällige, auch innerhalb eines codierenden Bereiches der Struktureinheit A liegende, bevorzugt jedoch um definierte, am 3'-terminalen Ende des codierenden Bereiches liegende Codons, beispielsweise Nonsense-Codons (UAG, UAA, UGA) oder beliebige Sinn-Codons, bevorzugt jedoch bezüglich des verwendeten Translationssystems seltene Sinn-Codons (z. B. AGA bei Verwendung eines *E. coli* Translationssystems) handeln.

Die ortsspezifische Kopplung an einem definierten Terminatorcodon kann vorzugsweise mittels zweier Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgen:

1. Die ortsspezifische Kopplung kann erfindungsgemäß unter Verwendung eines Sinn-Codons als Terminatorcodon erfolgen, welches nicht stromaufwärts im codierenden Bereich der Struktureinheit A bereits vorhanden ist. Vorzugsweise wird hierfür das seltene AGA-Codon herangezogen, wobei in diesem Fall der Translationsansatz keine für das AGA-Codon spezifische tRNA enthalten sollte. Am AGA-Codon findet erfindungsgemäß der Peptidyltransfer auf den Terminator statt, welcher in diesem Fall nicht mit den entsprechenden tRNA-Molekülen des Translationsgemisches um die Besetzung der Aminoacyl-Bindungsstelle des Ribo-

soms konkurriert.

2. Die ortsspezifische Kopplung kann erfindungsgemäß auch durch eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung erfolgen. Es ist erfindungsgemäß möglich, den Terminator über einen Spacer mit anderen Bereichen der Struktureinheit A zu verknüpfen. Im Falle der ortsspezifischen Kopplung mittels Codon-Anticodon-Wechselwirkung wird ein Spacer mit tRNA-Struktur gewählt, welcher am Terminatorcodon den Transfer der naszierenden Struktureinheit B auf den Terminator vermittelt. Vorzugsweise wird auch hierfür wie oben beschrieben das AGA-Codon herangezogen, so daß das Translationsgemisch entsprechend vorbehandelt werden sollte.

Im allgemeinen können als Spacer erfindungsgemäß beispielsweise natürliche und/oder synthetische Oligomere oder Polymere, wie z. B. beliebige Nukleinsäuresequenzen, eingesetzt werden. Die Verknüpfung des Spacers an weitere Bereiche der Struktureinheit A, wie z. B. das 3'-terminale Nukleotid einer mRNA, kann in beliebiger Weise erfolgen, vorzugsweise jedoch über die 3'-Position des terminalen Nukleotids. Es ist erfindungsgemäß zweckmäßig, diese Verknüpfung sowie weitere mögliche Verknüpfungen innerhalb der Struktureinheit A so zu wählen, daß diese unter Assay-Bedingungen nicht spaltbar sind. Somit wird auch gewährleistet, daß nach dem Transfer der naszierenden Polypeptidkette auf den Terminator ein weiterer Transfer auf eine neue Aminoacyl-tRNA unterbleibt. Derartige Verknüpfungen können sowohl kovalenter Natur sein als auch auf molekularen Wechselwirkungen, z. B. zwischen Streptavidin oder Avidin und Biotin, Nickel-NTA und oligo-Histidin, Protein und Ligand, Antikörper und Antigen, oder auch zwischen zwei hybridisierenden Nukleinsäuren, beruhen. Die Verknüpfung des Terminators mit einem Ribonukleinsäure-Spacer kann beispielsweise über die 2' und/oder 3'-Position erfolgen.

Die erfindungsgemäße Verbindung sowie das erfindungsgemäße Verfahren werden im folgenden beispielhaft anhand von Figuren dargestellt.

Fig. 1: Allgemeines Prinzip der ribosomalen katalysierten Kopplung eines Polypeptids an seine eigene mRNA in vitro.

Fig. 2: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch ein aliphatisches Amin.

Fig. 3: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch ein Puromycin-Molekül.

Fig. 4: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine mit Phenylalanin beladene, modifizierte tRNA.

Fig. 5: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine Anthraniloyl-tRNA.

Fig. 6: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, beladene Nonsense-Suppressor-tRNA.

Fig. 7: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, mit Puromycin beladene tRNA.

Fig. 8: Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine beladene tRNA, deren Aminosäure mit der mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 1 zeigt das allgemeine Prinzip der in vitro Genotyp-Phänotyp Kopplung unter Verwendung eines ribosomalen Translationssystems. An den codierenden, translatierbaren Bereich der Struktureinheit A schließt sich ein Terminatorcodon an, welches über einen Spacer

mit dem Terminator verknüpft ist. Nach Synthese des beschriebenen Konstruktes wird der codierende Bereich in vitro translatiert. Am Terminatorcodon gelangt der Terminator in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms. Die naszierende Polypeptidkette (Struktureinheit B) wird katalytisch auf den Terminator transferiert. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende über einen Terminator und einen Spacer stabil mit seiner codierenden Nukleinsäure verknüpft ist. Die Stabilität der Kopplung gewährleistet, daß nach Selektion des Polypeptids mit der gewünschten Eigenschaft gleichzeitig der genetische Bauplan zur Verfügung steht. Symbole: A und P, Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Bindungsstelle des Ribosoms; x Terminator.

Die Fig. 2 zeigt die Verwendung eines primären Amins als Terminator. Der codierende, translatierbare Bereich der Struktureinheit A ist hier eine mRNA, welche an Stelle eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon enthält, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Dessen 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-aminoadenosin-Rest auf, der eine aliphatische Aminogruppe trägt. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 3 zeigt die Verwendung eines Puromycin-Moleküls als Terminator. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Dessen 3'-Ende weist einen über die 5'-OH-Gruppe gekoppelten Puromycin-Rest auf. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 4 beschreibt die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine mit Phenylalanin beladene, modifizierte tRNA. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich eine beliebige Ribonukleinsäuresequenz anschließt. Deren 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-aminoadenosin-Rest auf, der kovalent an die X<sub>47</sub>-Base einer mit Phenylalanin beladenen, am 3'-Ende modifizierten tRNA gekoppelt ist. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und so die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-RNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 5 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine derivatisierte Anthraniloyl-tRNA. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich eine beliebige Ribonukleinsäuresequenz an-

schließt. Deren 3'-Ende weist einen 3'-Desoxy-3'-aminoadenosin-Rest auf, der kovalent an die X<sub>47</sub>-Base einer derivatisierten Anthraniloyl-tRNA gekoppelt ist. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon das modifizierte 3'-Ende des Spacers in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und so die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-tRNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 6 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, beladene Nonsense-Suppressor-tRNA. Die mRNA enthält das Stop-Codon UAG, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Der Spacer enthält die Nukleotidsequenz des Vorläufermoleküls einer Nonsense-Suppressor-tRNA und bildet eine entsprechende Tertiärstruktur aus. Das 3'-Ende ist durch eine stabile Amidbindung mit einer beliebigen (natürlichen oder unnatürlichen) Aminosäure verknüpft. Am Nonsense-Codon UAG kann der Spacer, der als beladende Suppressor-tRNA fungiert, in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-tRNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 7 zeigt die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine intramolekulare, mit Puromycin beladene tRNA. Die mRNA enthält statt eines Stop-Codons ein einziges AGA-Codon, an das sich ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Der Spacer enthält die Nukleotidsequenz des Vorläufermoleküls einer für das AGA-Codon spezifischen tRNA und bildet eine entsprechende Tertiärstruktur aus. Das 3'-terminale Nukleotid des Spacers (A<sub>76</sub>) weist einen Puromycin-Rest auf. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon der Spacer, der als beladene tRNA fungiert, in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-tRNA und mRNA verknüpft ist.

Die Fig. 8 verdeutlicht die Kopplung der naszierenden Polypeptidkette an ihre eigene mRNA durch eine beladene tRNA, deren Aminosäure mit der mRNA verknüpft ist. Die mRNA enthält ein einziges AGA-Codon, an das sich ein Stop-Codon und ein Spacer (hier Ribonukleinsäure) anschließt. Der Spacer ist am 3'-Ende über eine Phosphodiesterbindung mit der Seitenkette des Terminators kovalent verknüpft. Der Terminator wiederum ist über eine Aminoacylbindung an eine tRNA gebunden. Der Translationsansatz enthält keine für das Arginin-Codon AGA spezifischen tRNA-Moleküle, so daß am AGA-Codon der mit der mRNA gekoppelte Terminator in die Aminoacyl-Bindungsstelle des translatierenden Ribosoms gelangen und die naszierende Polypeptidkette auf den Terminator übertragen werden kann. Der darauf folgende Transfer des Peptidylrestes auf Wasser am Stop-Codon bewirkt die Freisetzung der AGA-spezifischen tRNA. Als Kopplungsprodukt entsteht ein Polypeptid, das am C-terminalen Ende kovalent mit dem Terminator, der Spacer-tRNA und mRNA verknüpft ist.

lent mit dem Terminator, der Spacer-tRNA und mRNA verknüpft ist. Weder die tRNA noch die Art der Aminosäure-Verknüpfung ist in dieser Ausführungsform verändert, so daß eine Bindung durch den Elongationsfaktor Tu unter nahezu natürlichen Bedingungen und somit ein effizienter Einbau des Terminatormoleküls ermöglicht werden.

Die experimentelle Umsetzung der in Fig. 8 dargestellten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann beispielhaft durch folgende Schritte erfolgen:

Vorbereitende Schritte: (Endprodukt einsetzbar für beliebige Kopplungsreaktionen)

1. Chemische Aminoacylierung des Diribonukleotids pC<sub>75</sub>pA<sub>76</sub> mit einer Aminosäure, deren Seitenkette R mit einem beliebigen Diribonukleotid oder Didesoxyribonukleotid modifiziert ist [R = -CH<sub>2</sub>-3'-pXpXp-5'];
2. Ligation des aminoacylierten Diribonukleotids mit einer für das Codon AGA spezifischen tRNA (C<sub>74</sub>-Ende!) durch T4-RNA-Ligase;
3. Reinigung der korrekten und funktionalen Ligationsprodukte (Aminoacyl-tRNAs) durch immobilisierten Elongationsfaktor EF-TU in Gegenwart von GTP;

Weitere Schritte: (abhängig von dem zu selektierenen Zielmolekül);

4. Diversifizierung des entsprechenden Polypeptid-Strukturgens durch chemische Resynthese (codon-based mutagenesis) oder durch Mutagenese- und/oder Rekombinations-PCR. Unter dem Begriff "codon-based mutagenesis" wird im Sinne der Erfindung eine chemische Synthese von DNA verstanden, bei der statt Monomer-Bausteinen Trimere eingesetzt werden, die jeweils für eine bestimmte Aminosäure codieren. Durch Mischen von Trimer-Bausteinen bei der Synthese kann der Einbau verschiedener Codons im gewünschten Verhältnis an jeder Position erzielt werden.
- Unter dem Begriff "Mutagenese-PCR" wird im Sinne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation von DNA verstanden, bei der durch bestimmte Bedingungen eine fehlerhafte Verdopplung der DNA erzwungen wird.
- Unter dem Begriff "Rekombinations-PCR" wird im Sinne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation von DNA verstanden, bei der durch Mischen von zufälligen DNA-Subfragmenten homologer Gene neue, mosaikartige Gene synthetisiert werden. Dieser Prozeß ist mit einer natürlichen Rekombination vergleichbar;
5. Erneute Amplifikation (Reamplification) der synthetisierten Strukturgene durch PCR, wobei der 5'-Primer einen Promotor (z. B. T7-Promotor) und eine Translationsinitiationsregion (einschließlich ATG-Start-Codon), während der 3'-Primer sechs Histidin-Codons, das Terminatorcodon AGA und das Nonsense-Codon TAG einführt;
6. Präparation einer Spacer-DNA (z. B. chemische Synthese oder durch PCR), deren 5'-terminale Sequenz mit der 3'-terminalen Sequenz des reamplifizierten Strukturgens überlappt;
7. Verspleißen beider DNA-Fragmente durch SOE-PCR (splicing by overlap extension), wobei der Spacer den 3'-terminalen Fusionspartner bildet.

Unter dem Begriff "SOE-PCR" wird im Sinne der Erfindung eine in-vitro-Amplifikation von DNA verstanden, bei der aufgrund überlappender Bereiche zwei DNA-Fragmente miteinander verspleißt werden;

8. In-vitro-Transkription des Fusionsgens mit m<sup>7</sup>GpppG (5'-Cap-Struktur) als Primer (z. B. mit T7-DNA-Polymerase);
9. Reinigung des run-off-Transkriptes durch Polyacrylamidgelektrophorese;
10. Ligation der synthetisierten RNA (freies 3'-OH-Ende; 5'-Ende durch Cap-Struktur geschützt) mit der Aminosäure-Seitenkette der aminoacylierten tRNA durch T4-RNA-Ligase;
11. Reinigung des Produktes durch Polyacrylamid-gelektrophorese;

12. In-vitro-Translation der mRNA und Kopplung der naszierenden Polypeptidkette durch die für das AGA-Codon spezifische, aminoacylierte tRNA in Gegenwart eines E. coli Translationsgemisches, das durch entsprechende Vorbehandlung keine für das Arginin-Codon AGA spezifische tRNA-Moleküle mehr enthält;

13. Abtrennung der Translationsfaktoren und Reinigung der Fusionsmoleküle durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Matrix.

Unter dem Begriff "Nickel-NTA-Matrix" wird im Sinne der Erfindung eine Matrix verstanden, die aufgrund eines immobilisierten Nickelions die Reinigung von Oligohistidinhaltigen Biomolekülen ermöglicht;

14. In-vitro-Selektion von Fusionsmolekülen mit gewünschten Eigenschaften (z. B. durch Panning);  
 15. Reverse Transkription der angereicherten Fusionsmoleküle und Reamplifikation der genetischen Information durch PCR, wobei der 5'-Primer wiederum den Promoter und die Translationsinitiationsregion einführt, während der 3'-Primer mit der 3'-terminalen Sequenz des Spacers hybridisiert;  
 16. Wiederholung des beschriebenen Verfahrens ab Schritt 8.

Die experimentelle Umsetzung des ersten vorbereitenden Schrittes kann insbesondere auch unter Verwendung einer Aminosäure, deren Seitenkette mit einem beliebigen Oligoribonukleotid oder Oligodesoxyribonukleotid modifiziert ist, erfolgen.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, wenn die Seitenkette der Aminosäure ein freies 5'-OH-Ende aufweist, welches erst nach Ligation gemäß Schritt 2 5'-phosphoryliert wird. In vorteilhafter Weise läßt sich somit die Ausbeute von funktionalen Ligationsprodukten erhöhen.

In Anlehnung an Fig. 8 befindet sich in einer weiteren Ausführungsform mindestens ein Sinn-Codon zwischen Terminatorcodon und Stop-Codon. Auf diese Weise wird eine Kopplung zwischen Terminator und Polypeptidkette nicht mehr auf deren C-terminale Aminosäure beschränkt.

#### Patentansprüche

1. Verbindung aus einer Struktureinheit A (Genotyp) und einer weiteren Struktureinheit B (Phänotyp), bei der Genotyp und Phänotyp dauerhaft miteinander verbunden sind, wobei die Struktureinheit A neben anderen Bereichen mindestens einen für mindestens ein aus Aminosäureeinheiten aufgebau-

tes, polymeres Molekül codierenden Bereich aufweist und der oder die codierenden Bereich(e) translatierbar ist oder sind, weiterhin in der Struktureinheit A eine erste Strukturuntereinheit (Terminator) in einem nicht translatierten Abschnitt angeordnet ist, die die Struktureinheit B als Translationsprodukt der Struktureinheit A mit der Struktureinheit A dauerhaft verbindet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verknüpfung der Struktureinheit A mit der durch Translation entstandenen Struktureinheit B über eine auf der Struktureinheit A angeordnete zweite Strukturuntereinheit gesteuert wird.

3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei die zweite Strukturuntereinheit ein Codon (Terminator-Codon) ist.

4. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Struktureinheit A eine modifizierte mRNA ist und die Struktureinheit B eine aus der mRNA translatierte Polypeptidkette ist.

5. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Terminator über einen Spacer mit anderen Bereichen der Struktureinheit A verknüpft ist.

6. Verbindung nach Anspruch 5, wobei der Spacer mit dem Terminatorcodon der Struktureinheit A in Wechselwirkung tritt.

7. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Terminator eine nucleophile chemische Gruppe ist, die einen Carbonsäureester unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu spalten vermag.

8. Verbindung nach Anspruch 7, wobei die nucleophile chemische Gruppe eine organische Aminogruppe ist.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Terminator einen Carbonsäureester zwischen einer tRNA und der Struktureinheit B spaltet und eine dauerhafte Verbindung zwischen den Struktureinheiten A und B ausgebildet wird.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Verknüpfung zwischen den Struktureinheiten A und B durch eine kovalente Verbindung erfolgt.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Terminator, insbesondere als nucleophile Gruppe über eine Bindung an einen Spacer mit tRNA Struktur gebunden ist, der mit dem Terminatorcodon der Struktureinheit A, die insbesondere eine mRNA ist, in Wechselwirkung treten kann.

12. Verfahren zur molekularen Genotyp/Phänotyp-Kopplung mittels einer Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktureinheit A mit einem Translationssystem umgesetzt wird in Gegenwart von zur Translation benötigten Substanzen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die gekoppelten Genotypen/Phänotypen isoliert werden.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

**- Leerseite -**

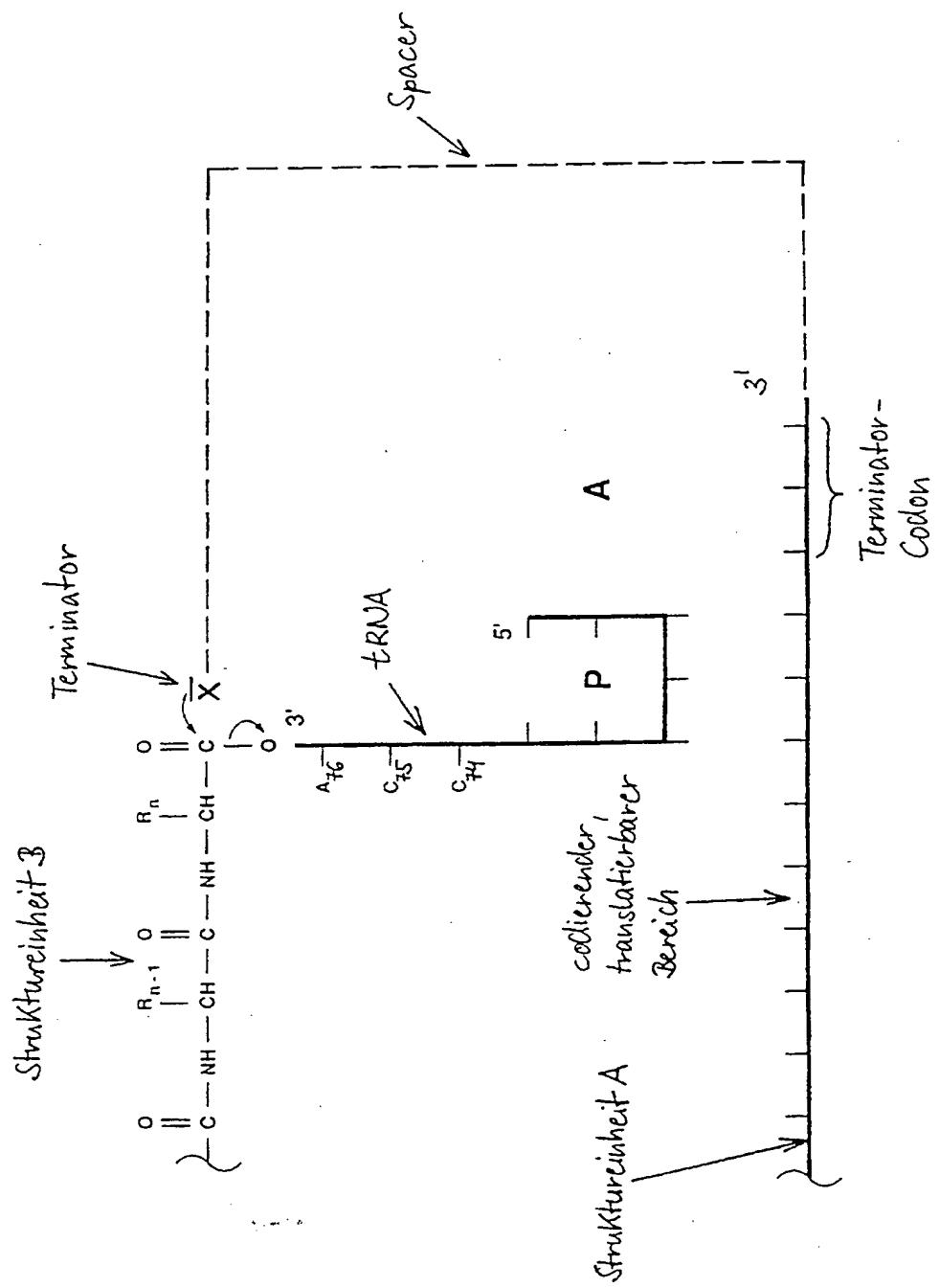


Fig. 1

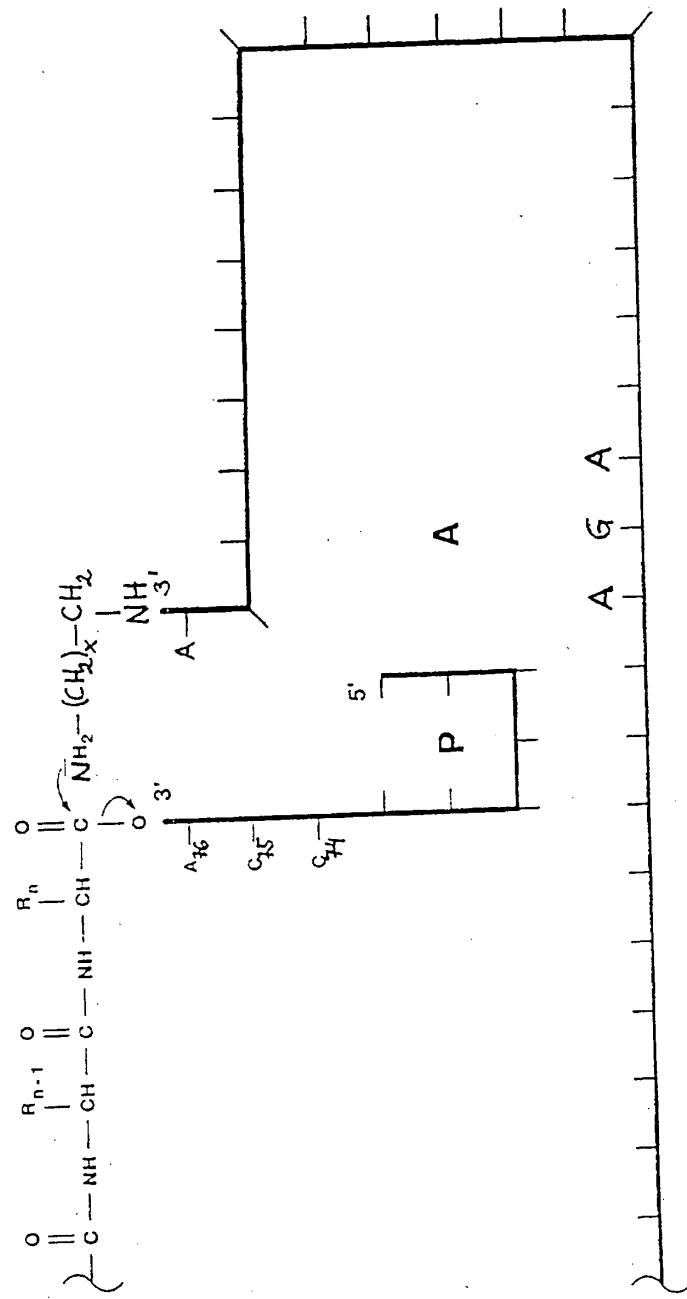


Fig. 2

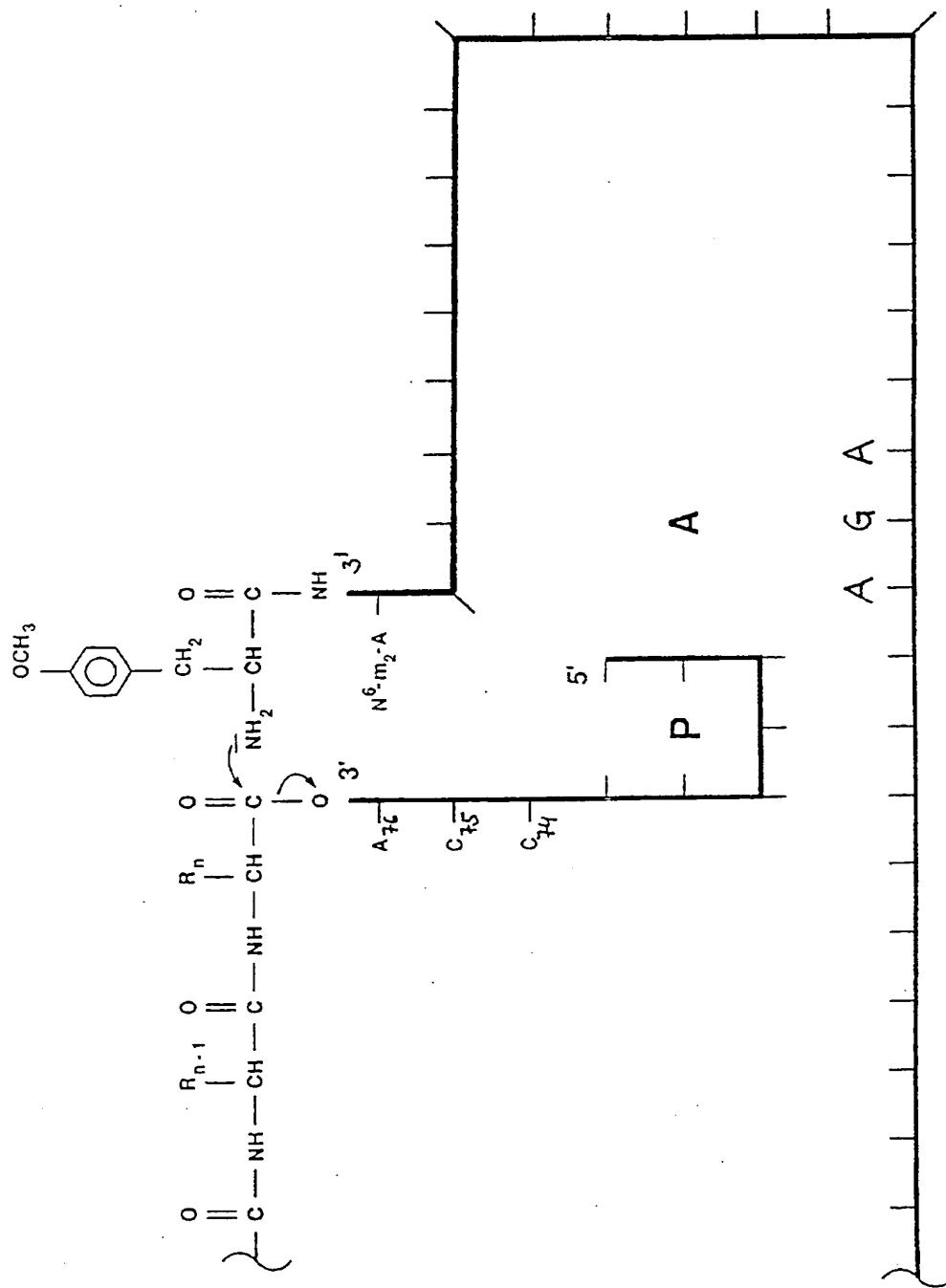


Fig. 3

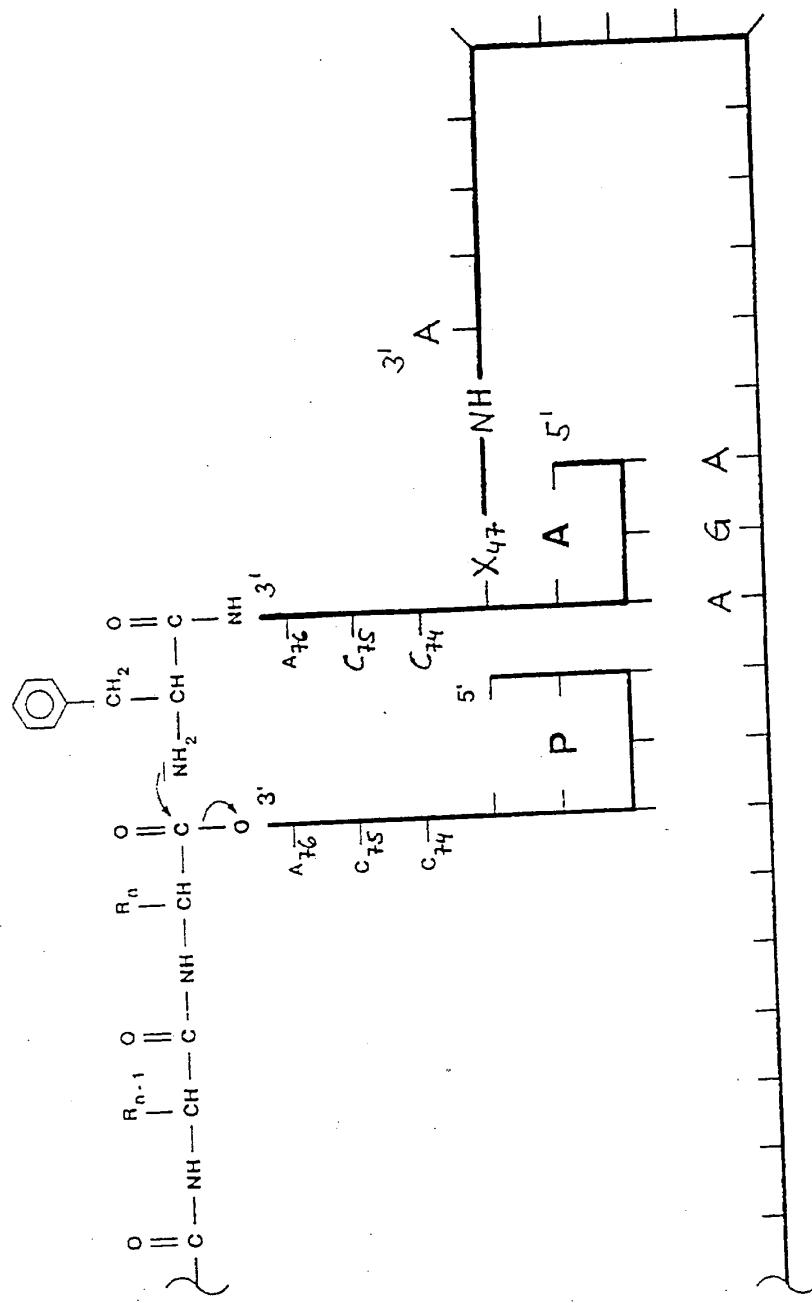


Fig. 4

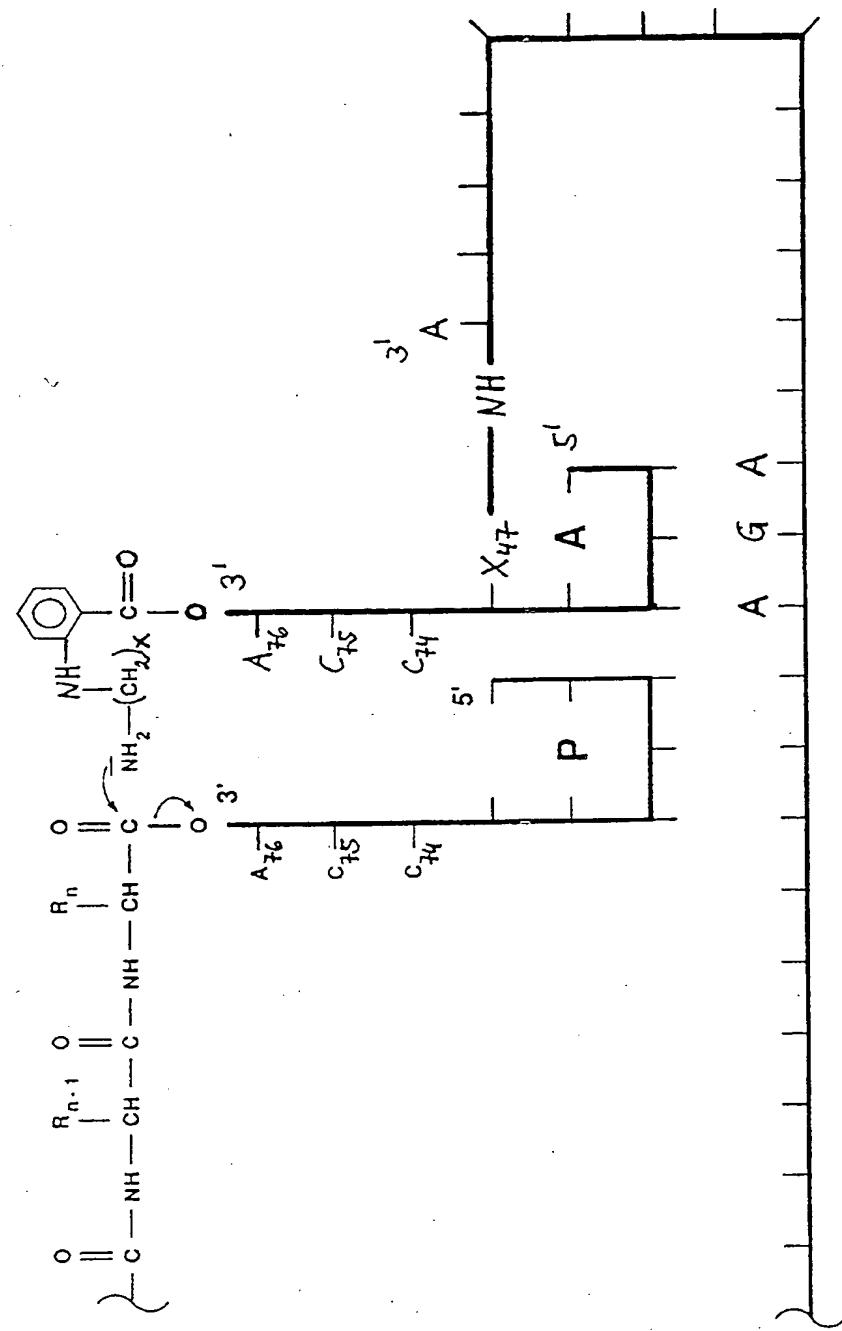


Fig. 5

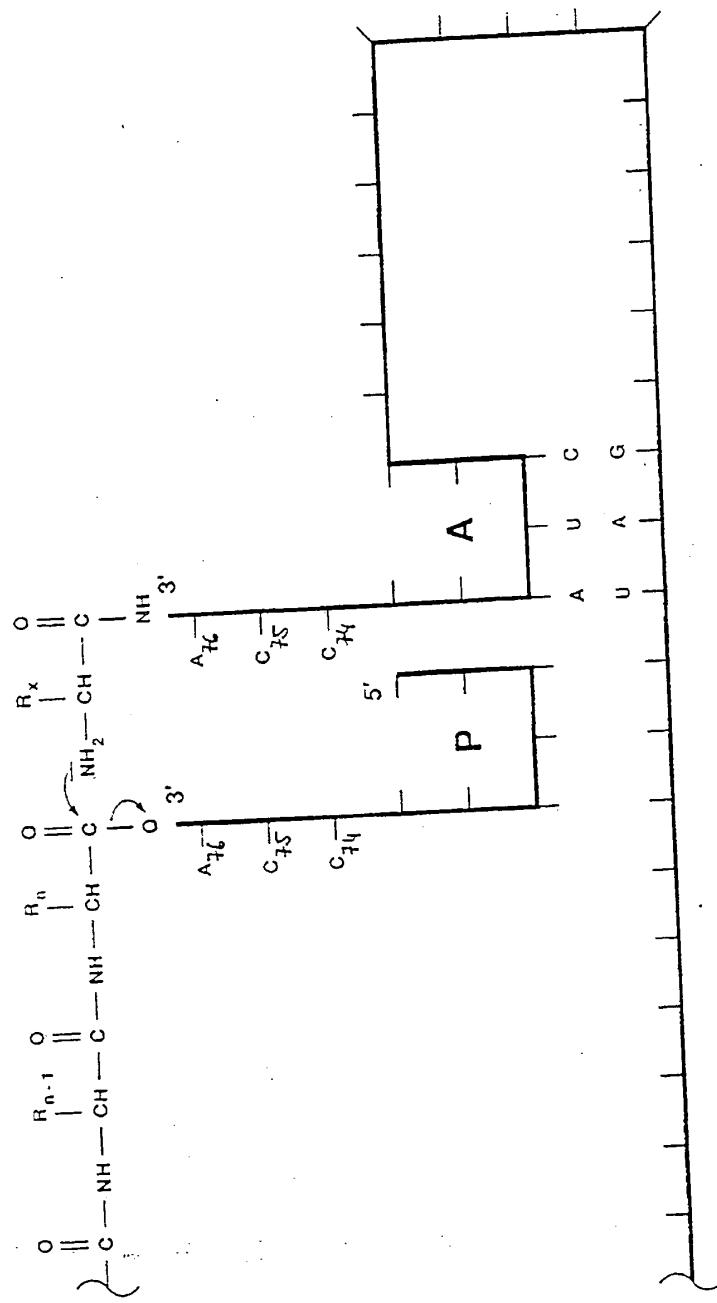


Fig. 6

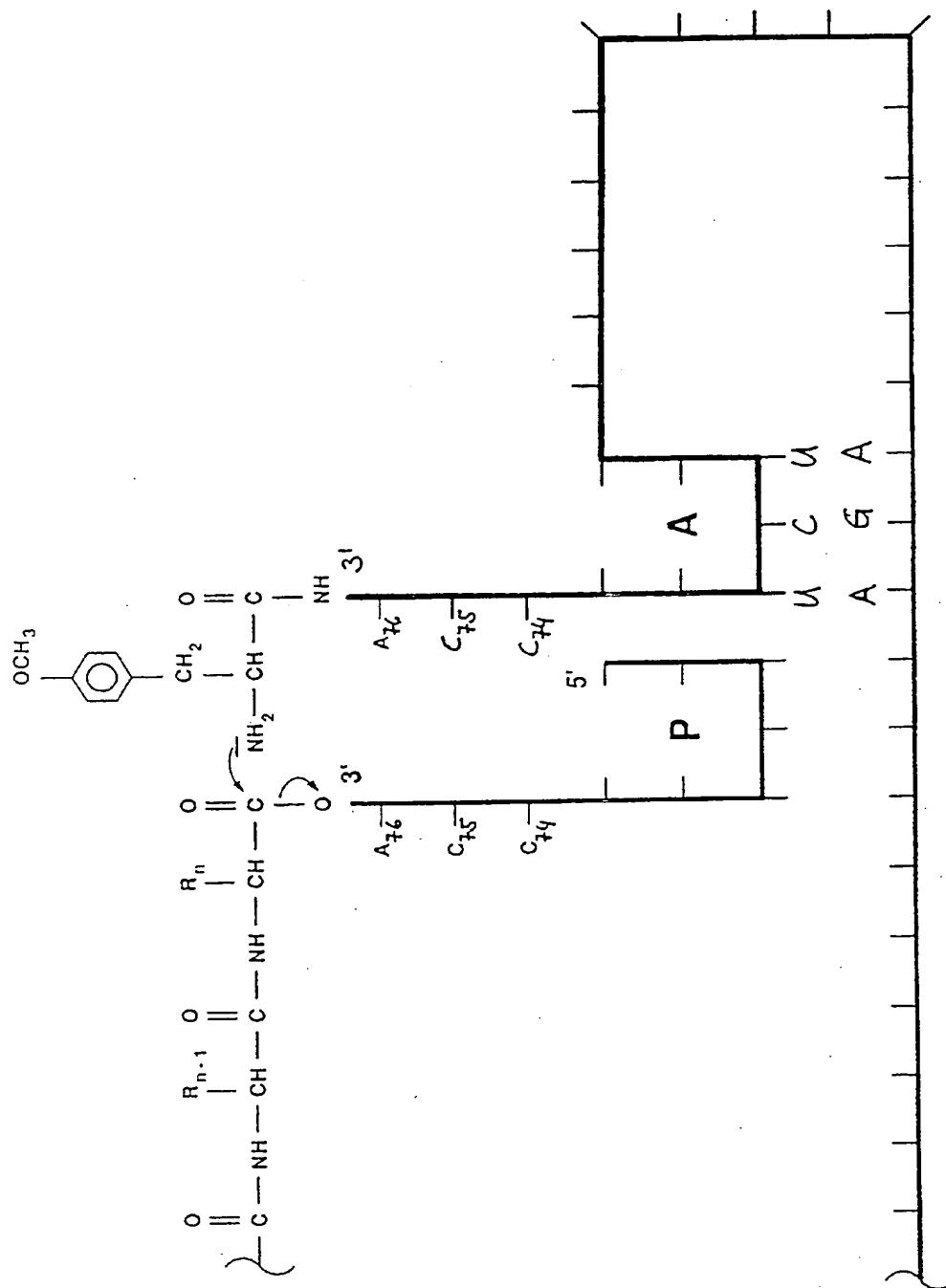


Fig. 7

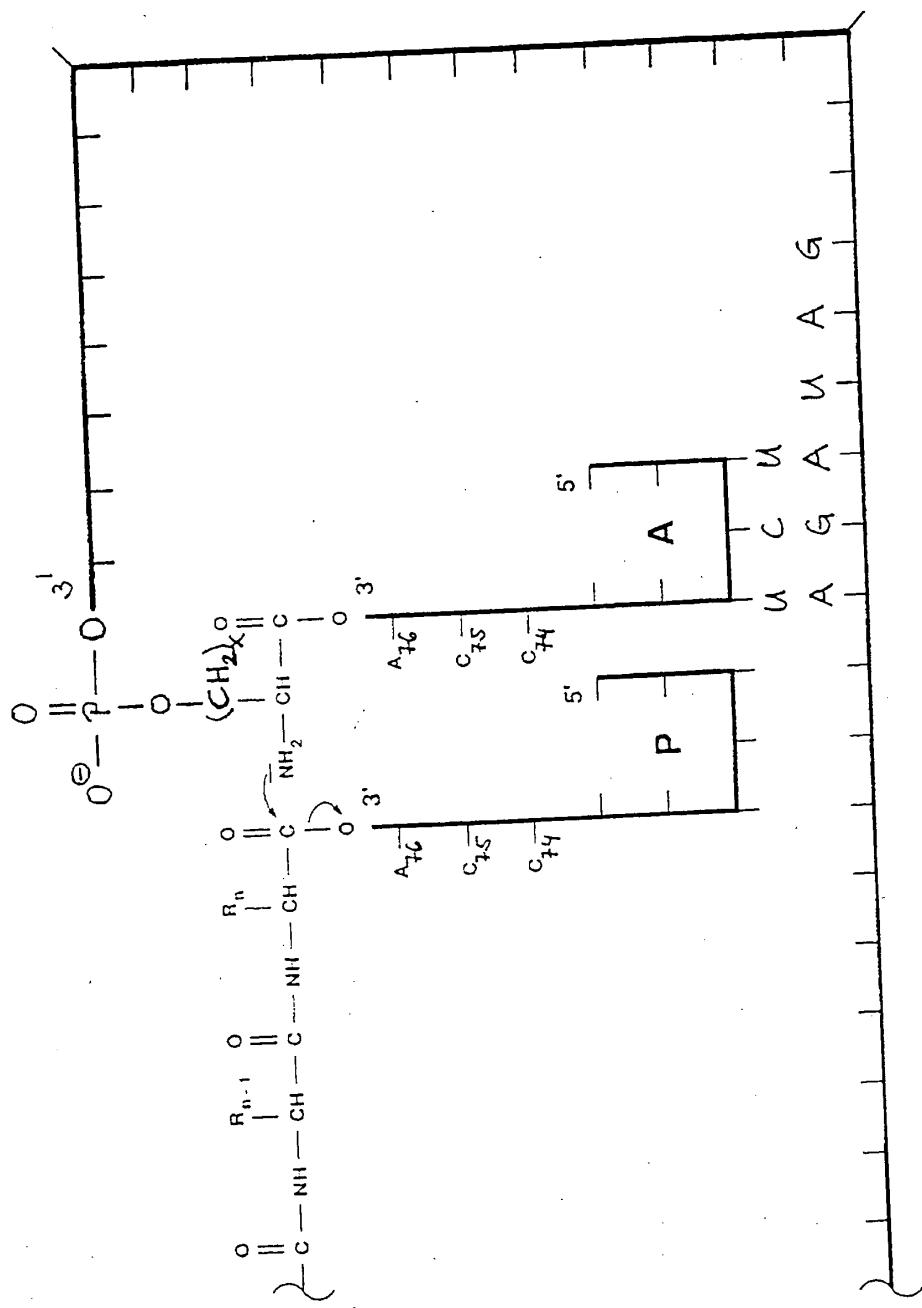


Fig. 8